不同越冬饲料对蜜蜂中肠消化酶活性、组织发育状态以及抗氧化酶基因表达的影响[1]

刘春蕾　胥保华　刘振国　王　颖　王红芳*

（山东农业大学动物科技学院，泰安 271018）

摘　要：本试验旨在研究不同越冬饲料对蜜蜂中肠消化酶活性、组织发育状态以及抗氧化酶基因表达的影响，以便为广大蜂农选择越冬饲料提供参考。在 2015 年 10 月底选取群势相当的本地意大利蜜蜂（*Apis mellifera* L.）越冬蜂群（群内无储备越冬饲料脾）9 群（5 框蜂/群），随机分为 3 个试验组（3 群/组），从 11 月 2 号开始分别以蜂蜜(蜂蜜组)、果葡糖浆(果葡糖浆组)和白砂糖水（白砂糖：水=2：1，蔗糖组）为越冬饲料进行饲喂，饲喂至 11 月下旬蜂群进入越冬期。整个试验期为 2015 年 10 月底至 2016 年 3 月初。分别于越冬前（11 月初）、越冬中期（1 月初）和越冬后（3 月初）采集蜜蜂中肠，测定中肠消化酶（淀粉酶、蔗糖酶和蛋白酶）活性，在越冬中期采集蜜蜂中肠用于中肠组织发育状态和抗氧化酶基因[超氧化物歧化酶 1（*Sod*1）、超氧化物歧化酶 1（*Sod*2）和过氧化氢酶（*CAT*）]相对表达量等指标的检测。结果表明：在越冬中期，果葡糖浆组和蜂蜜组的蜜蜂中肠内淀粉酶活性显著高于蔗糖组（$P<0.05$）。在越冬中期和越冬后，饲喂不同越冬饲料的蜜蜂中肠内蔗糖酶活性差异不显著（$P>0.05$）。在越冬中期，果葡糖浆组的蜜蜂中肠内蛋白酶活性显著高于蔗糖组和蜂蜜组（$P<0.05$）。蜂蜜组和蔗糖组的蜜蜂中肠肠壁厚度极显著大于果葡糖浆组（$P<0.01$），且蜂蜜组和蔗糖组的蜜蜂中肠隐窝深度也极显著大于果葡糖浆组（$P<0.01$）。在越冬中期，蔗糖组的蜜蜂中肠 *Sod*1 基因的相对表达量显著高于蜂蜜组和果葡糖浆组（$P<0.05$）。由此得出，蜂蜜能够提高越冬蜂中肠消化酶活性，蜂蜜和白砂糖有利于越冬蜂中肠组织的发育，而且白砂糖能够提高越冬蜂中肠抗氧化酶基因的表达。因此，蜂蜜和白砂糖比果葡糖浆更适合作为蜜蜂的越冬饲料。

关键词：糖源类型；越冬饲料；蜜蜂；中肠消化酶；中肠组织；抗氧化酶

中图分类号：S816　　文献标识码：A　文章编号：

收稿日期：2016-09-14

基金项目：国家蜂产业技术体系建设专项资金(CARS-45)；山东省农业良种工程项目“优质高产蜜蜂及蚕桑新品种培育”（2014—2016）

作者简介：刘春蕾（1991-），男，山东安丘人，硕士研究生，从事蜜蜂的营养与饲料研究。E-mail： liuchunleiv@126.com

*通信作者：王红芳，讲师，E-mail: wanghongfang22@163.com

在我国北方地区，冬季气候寒冷，外界无蜜源，蜜蜂越冬期间无法从外界获取食物，只能消耗越冬前期贮备的饲料。因此，越冬饲料质量的好坏直接影响着蜂群的越冬性能。自然状态下蜜蜂在越冬期间取食的饲料应该为蜂蜜，但是，蜂农为了追求蜂产品产量和利润，秋天大都不给蜂群储备足够的蜂蜜作为越冬饲料，而是改喂价格相对便宜的白砂糖[1]。近年来，由于白砂糖价格不断攀升，使得越来越多的蜂农采用廉价的果葡糖浆替代白砂糖作为越冬饲料。果葡糖浆，也称高果糖浆(high fructose syrup)或异构糖浆，是以酶法转化淀粉所得的糖化液经葡萄糖异构酶的异构作用，将其中一部分葡萄糖异构成果糖，由葡萄糖和果糖组成的一种混合糖糖浆[2]。目前，对于果葡糖浆用作蜜蜂越冬饲料的安全性尚存在许多争议。李中礼[3]和沈育初[4]认为果葡糖浆可以替代白砂糖饲喂蜂群，而陈渊[5]和李家柱[6]则认为果葡糖浆用作蜜蜂越冬饲料会使蜂群受到严重损失，如：蜂群出现群势变差或者见子（卵）不见虫的现象。由于缺乏蜜蜂越冬期间的饲养标准，蜂农在选择越冬饲料时缺乏科学依据。

鉴于此，本研究分别以白砂糖、蜂蜜、果葡糖浆作为越冬饲料对蜜蜂进行饲喂，通过比较 3 种越冬饲料对蜜蜂中肠消化酶活性、组织发育状态以及抗氧化酶基因表达的影响，来评价 3 种越冬饲料作为蜜蜂越冬饲料的适用性，旨在为广大蜂农更好地选择越冬饲料提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用蜜蜂为本地意大利蜜蜂（*Apis mellifera* L.），由山东农业大学蜂场提供；试验所用蜂蜜由山东农业大学蜂场提供，白砂糖由云南德宏英茂糖业有限公司弄璋糖厂提供，果葡糖浆由临沂沂水鲁洲生物科技有限公司提供。

1.2 试验地点及时间

试验于 2015 年 10 月底至 2016 年 3 月初在山东农业大学蜂场进行。

1.3 试验设计

选取群势相当的本地意大利蜜蜂越冬蜂群（群内无储备越冬饲料脾）9 群（5 框蜂/群），随机分为 3 个试验组（蜂蜜组、果葡糖浆组和蔗糖组），每组设 3 个重复。蜂蜜组以蜂蜜作为越冬饲料，果葡糖浆组以果葡糖浆作为越冬饲料，蔗糖组以白砂糖水（白砂糖：水=2：1）作为越冬饲料。

1.4 蜂群管理

试验开始前对所有蜂群进行逐一检查，确保每一蜂群内没有储备好的越冬饲料脾。试验开始后于每天的傍晚将饲料盛到相应巢内的饲喂盒内，每次饲喂时都将饲喂盒盛满（约 1.5 kg），一直饲喂到 11 月下旬蜂群完全进入到越冬状态时停止进行饲喂，以保证蜂群储备足够的越冬饲料。

1.5　测定指标及方法

1.5.1　样本处理方法

在整个试验期内一共取 3 次样品，在越冬前（11 月初）、越冬中期（1 月初）和越冬后（3 月初）3 个时间点分别进行取样。其中越冬前取样时每个试验组取 45 只蜜蜂，随机分为 3 个重复，每重复 15 只蜜蜂，统一作为饲喂之前蜂群的整体水平。而越冬中期和越冬后采样时每次每群取 45 只蜜蜂，随机分为 3 个重复，每个重复 15 只蜜蜂。用镊子分别夹住蜜蜂的腹柄和螯针或第 7 腹节，将蜜蜂的肠道拉出，截取其中肠，放在 1.5 mL 离心管中准确称重，按重量（g）：体积（mL）=1:9 加入生理盐水，在冰浴条件下机械匀浆，2 500 r/min 离心 10 min 后取上清，配制成 10%的匀浆液。然后取部分上述 10%的匀浆液用生理盐水按 1:9 比例稀释成 1%的匀浆液。10%的匀浆液用于测定中肠消化酶活性，1%的匀浆液用于测定蜜蜂中肠蛋白质浓度。

在越冬中期，按照上述方法分组和取样，将蜜蜂的肠道拉出后，截取其中肠放入多聚甲醛固定液中，用于制作中肠组织切片；按同样的分组和取样方法截取蜜蜂中肠用于提取蜜蜂总 RNA。

1.5.2　蜜蜂中肠蛋白质浓度测定

将 1.5.1 中 1%的匀浆液采用蛋白质定量测试盒（南京建成生物工程研究所生产，货号 A045-2）测定蜜蜂中肠蛋白质浓度（考马斯亮蓝法）。

1.5.3　蜜蜂中肠淀粉酶活性测定

将 1.5.1 中 10%的匀浆液采用淀粉酶测试盒（南京建成生物工程研究所生产，货号 C016）测定蜜蜂中肠淀粉酶活性（碘-淀粉比色法）。

1.5.4　蜜蜂中肠蔗糖酶活性测定

将 1.5.1 中 10%的匀浆液采用二糖酶测试盒（南京建成生物工程研究所生产，货号 A082-2）测定蜜蜂中肠蔗糖酶活性（比色法）。

1.5.5 蜜蜂中肠蛋白酶活性测定

将 1.5.1 中 10%的匀浆液采用胃蛋白酶测试盒（南京建成生物工程研究所生产，货号A080-1）测定蜜蜂中肠蛋白酶活性（比色法）。

1.5.6 蜜蜂中肠组织发育状态观察

将固定好的中肠进行苏木精-伊红（HE）染色，制作切片（由武汉谷歌生物科技有限公司制作），在 10×显微镜下对中肠组织结构进行观察。

1.5.7 蜜蜂中肠抗氧化酶基因表达检测

采用 Trizol 法提取总 RNA，使用反转录试剂盒（TaKaRa）将提取的 RNA 样品反转录为 cDNA，放在-20 ℃保存。采用荧光定量 PCR 法对中肠抗氧化酶基因——超氧化物歧化酶 1（*Sod*1）、超氧化物歧化酶 2（*Sod*2）和过氧化氢酶（*CAT*）的相对表达量进行检测。取 2 μL cDNA 加入到 20 μL 荧光定量体系中，按照荧光定量试剂盒（TaKaRa）操作指南，用荧光定量 PCR 仪检测目的基因的相对表达量。目的基因引物设计参考序列来自于 NCBI 数据库，以β-肌动蛋白（β-actin）为内参基因，采用 Primer 5.0 进行引物设计，委托生工生物工程（上海）股份有限公司合成，引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer pairs used in the amplification of *Sod 1*, *Sod 2*, *CAT* 和 *β-Actin* genes

目的基因 Target genes	基因编号 Gene ID	引物序列（5’-3’） Primer sequences	产物长度 Product size/bp	R^2
超氧化物歧化酶 1		F:AAGTGCTGGTGCACATTTCA	109	0.998 8
*Sod***1**	GB10133	R:AACACCACTTGCATCTGCTTC		
超氧化物歧化酶 2		F:CGCCAAAGGTGATGTCAATA	121	0.990 4
*Sod***2**	GB14346	R:GTCTGGTTTACCGCCATTTG		
过氧化氢酶		F:CTTACCAACAGGAATGAGTGGA	139	0.999 3
CAT	GB11648	R:TGCCAAGAATCAATACCCAAC		
β-肌动蛋白		F:CCGTGATTTGACTGACTACCT	142	0.996 9
β-actin	GB17681	R:AGTTGCCATTTCCTGTTC		

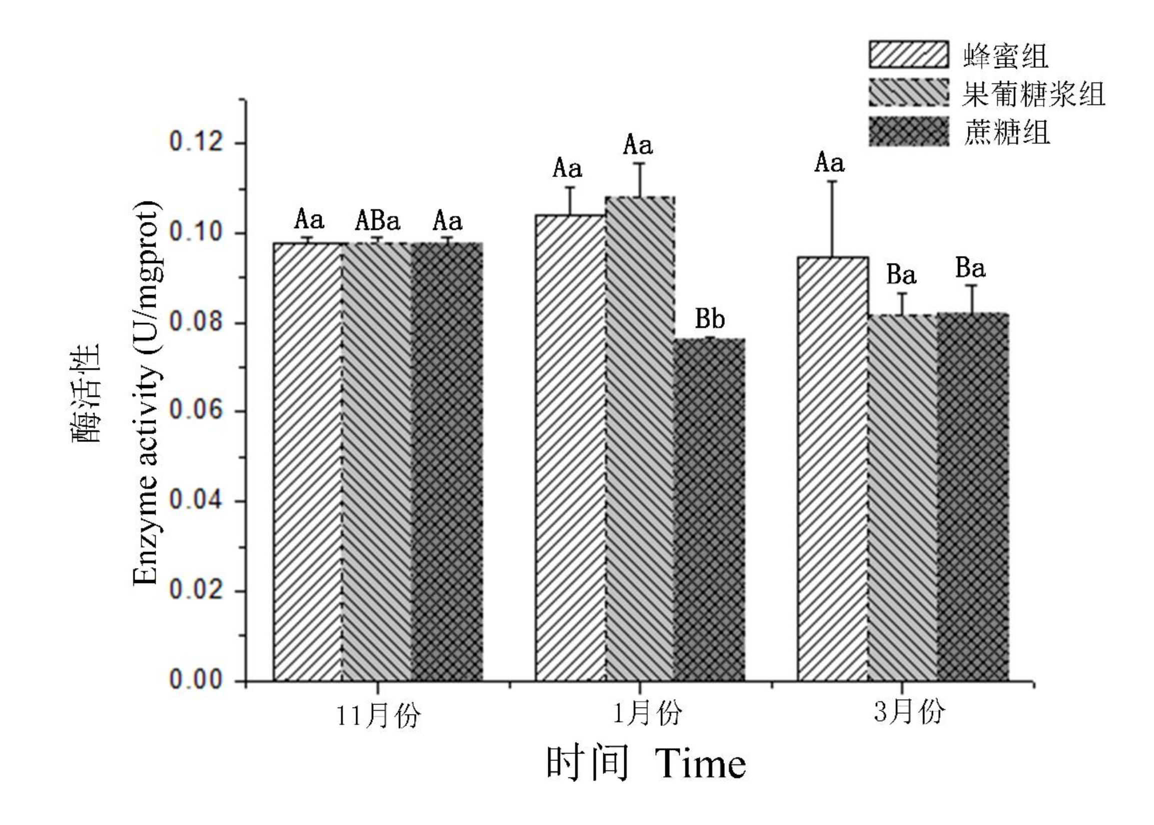
1.6 数据处理与分析

数据采用 SAS 9.2 软件进行单因素方差分析（one-way ANOVA），并采用 Duncan 氏法进行多重比较，以 $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同越冬饲料对蜜蜂中肠淀粉酶活性的影响

通过对蜜蜂中肠淀粉酶活性（图 1）进行分析发现，在越冬中期（1 月初），蜂蜜组和果葡糖浆组的蜜蜂中肠内淀粉酶活性显著高于蔗糖组（P<0.05）；而在越冬后（3 月初），饲喂 3 种越冬饲料的蜜蜂中肠内淀粉酶的活性无显著差异（P>0.05）。在整个试验期内，蜂蜜组的蜜蜂中肠内淀粉酶活性没有发生显著变化（P>0.05），而蔗糖组的蜜蜂中肠内淀粉酶活性在越冬中期和越冬后显著低于越冬前（P<0.05），果葡糖浆组的蜜蜂中肠内淀粉酶活性在越冬后显著低于越冬中期（P<0.05）。



数据柱标注相同字母表示差异不显著(P＞0.05)，不同小写字母表示不同饲料组之间差异显著(P＜0.05)，不同大写字母表示不同取样时间点差异显著(P＜0.05)。图 2、图 3 同。

Date columns with the same letters mean no significant difference (P＞0.05), while with different small letters mean significant difference among different feed groups (P＜0.05), and with different capital letters mean significant difference among different sampling time points (P＜0.05). The same as Fig.2 and Fig.3.

图 1　中肠淀粉酶活性

Fig.1　Amylase activity of midgut

2.2　不同越冬饲料对蜜蜂中肠蔗糖酶活性的影响

通过对蜜蜂中肠蔗糖酶活性（图 2）进行分析发现，在越冬中期和越冬后，蜂蜜、果葡

糖浆和白砂糖 3 种不同越冬饲料对蜜蜂中肠内蔗糖酶活性的影响不显著（$P>0.05$）。而在整个试验期内，随着试验的进行，饲喂不同越冬饲料的 3 组蜜蜂中肠内蔗糖酶活性统一呈现出逐渐增强的趋势。蜂蜜组的蜜蜂中肠内蔗糖酶活性在越冬后显著高于越冬前和越冬中期（$P<0.05$），果葡糖浆组和蔗糖组蜜蜂中肠内蔗糖酶活性在越冬中期和越冬后显著高于越冬前（$P<0.05$），同时在越冬中期还显著高于越冬前（$P<0.05$）。

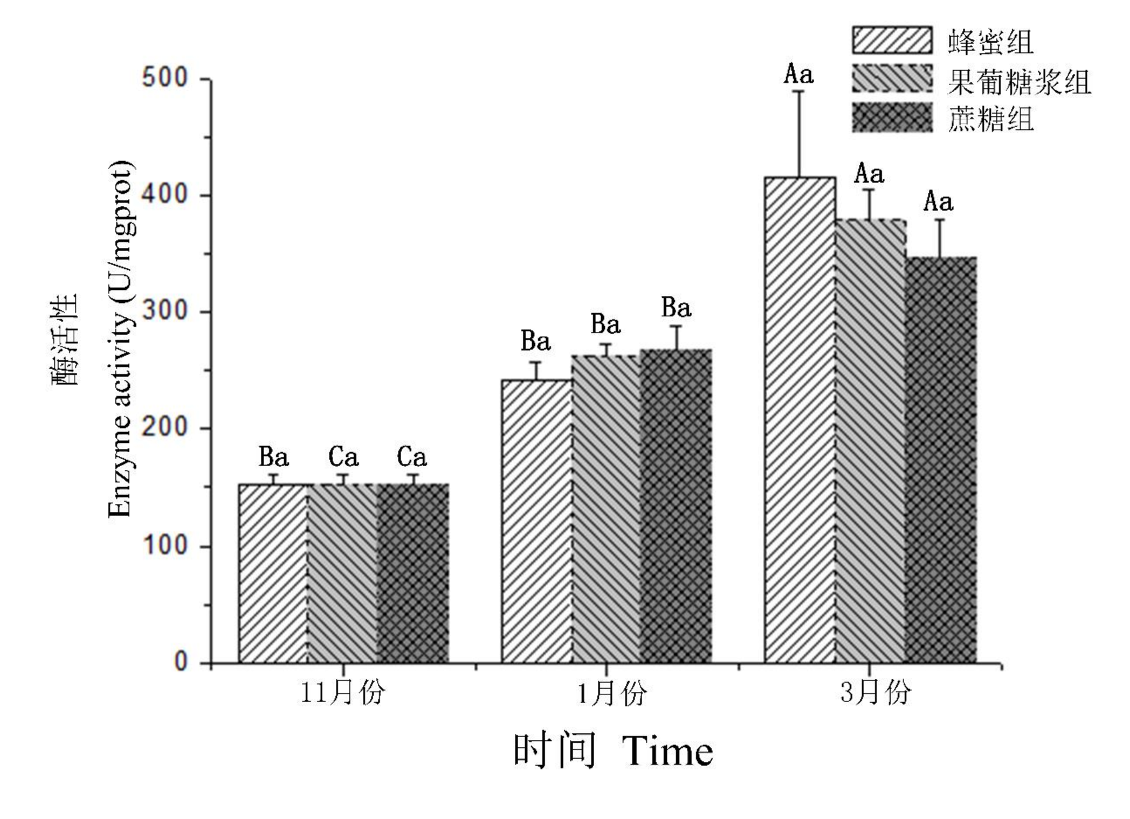


图 2　中肠蔗糖酶活性

Fig.2　Sucrase activity of midgut

2.3　不同越冬饲料对蜜蜂中肠蛋白酶活性的影响

通过对蜜蜂中肠蛋白酶活性（图 3）进行分析发现，在越冬中期，的蜜蜂中肠内蛋白酶活性在 3 组之间存在显著的差异（$P<0.05$），以果葡糖浆组最高，蜂蜜组次之，蔗糖组最低；而在越冬后，蜜蜂中肠内蛋白酶活性各组之间差异不显著（$P>0.05$）。在整个试验期内，蜂蜜组的蜜蜂中肠内蛋白酶活性在越冬前显著高于越冬中期（$P<0.05$），果葡糖浆组的蜜蜂中肠内蛋白酶活性在越冬中期显著高于越冬前和越冬后（$P<0.05$），蔗糖组的蜜蜂中肠内蛋白酶活性在越冬中期显著低于越冬前和越冬后（$P<0.05$），同时在越冬后显著低于越冬前（$P<0.05$）。

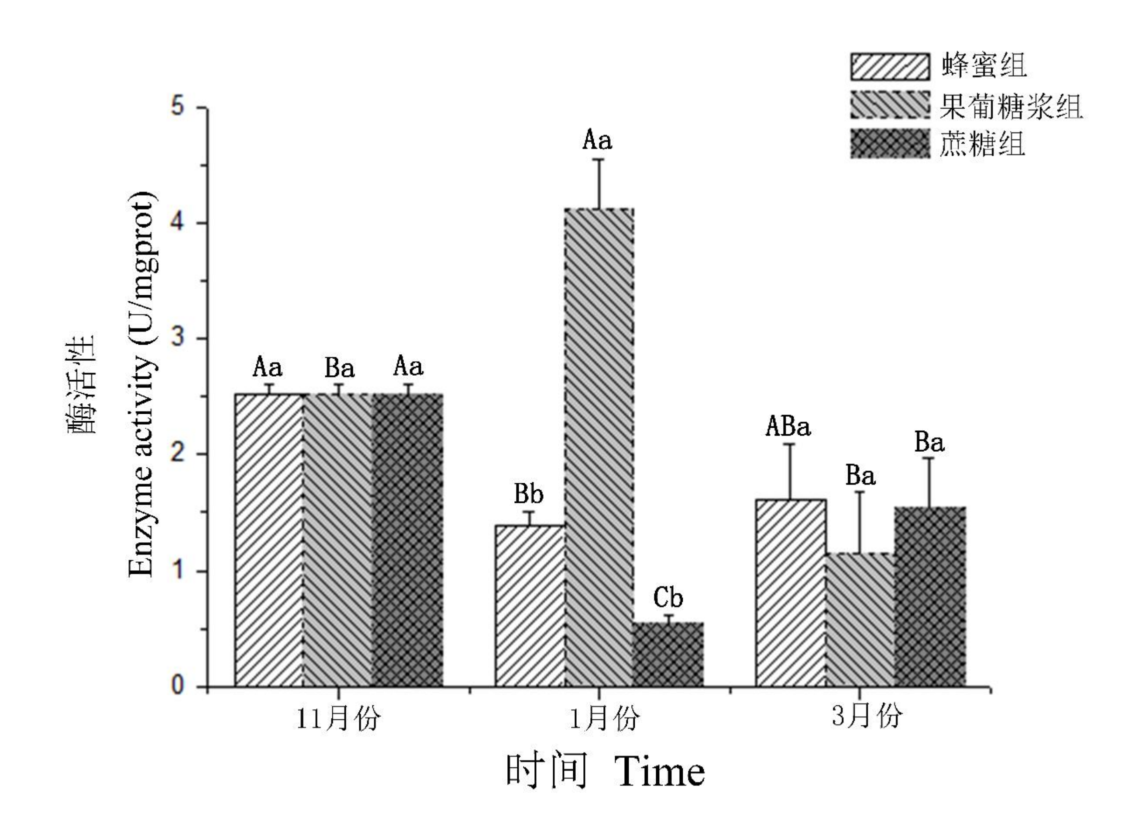
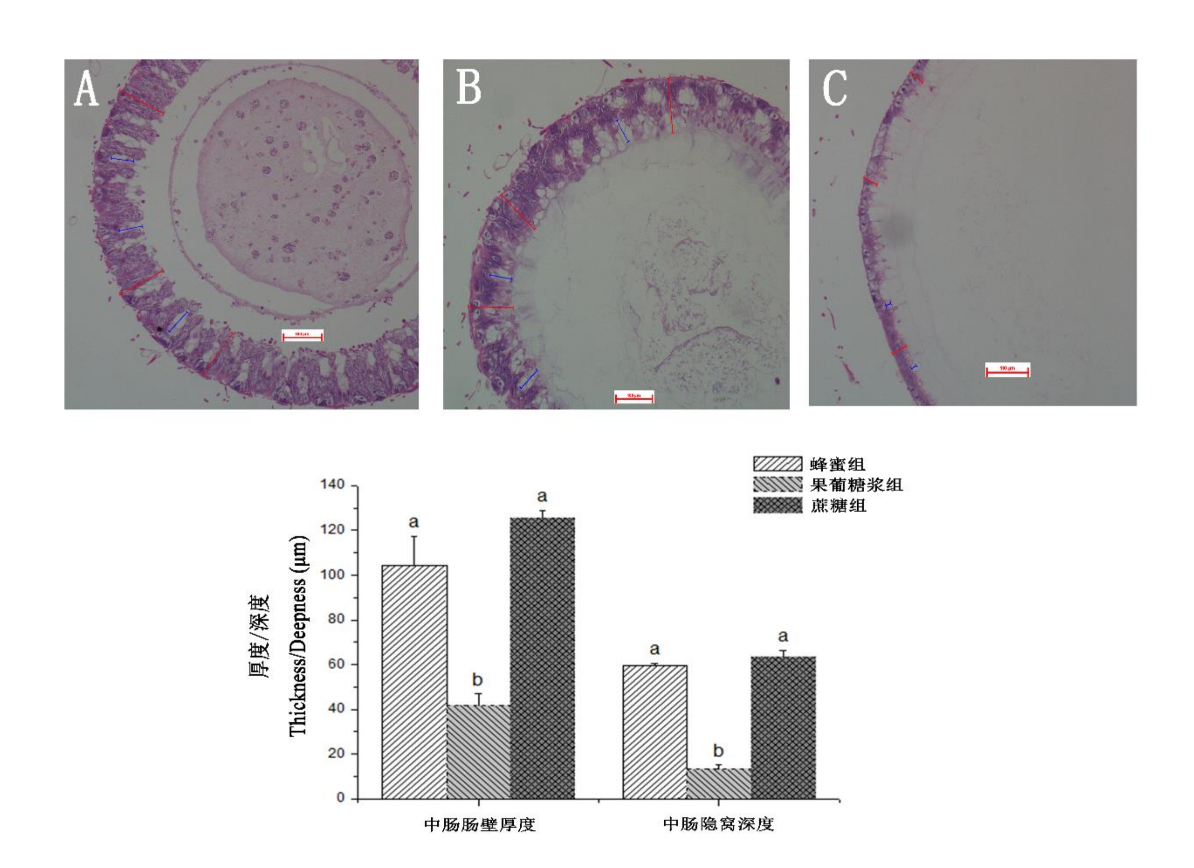


图 3 中肠蛋白酶活性

Fig.3 Protease activity of midgut

2.4 不同越冬饲料对蜜蜂中肠组织发育状态的影响

由图 4 可知，蜂蜜组和蔗糖组的蜜蜂中肠肠壁厚度极显著大于果葡糖浆组（P<0.01），同时蜂蜜组和蔗糖组的蜜蜂中肠隐窝深度要比果葡糖浆组深，且差异极显著（P<0.01）。



A:蔗糖组中肠切片；B:蜂蜜组中肠切片；C:果葡糖浆组切片。图中红色线段表示肠壁厚度，蓝色线段表示隐窝深度（HE 染色,10×）。数据柱标注相同字母表示差异不显著(P＞0.05)，不同字母表示差异极显著(P＜0.01)。

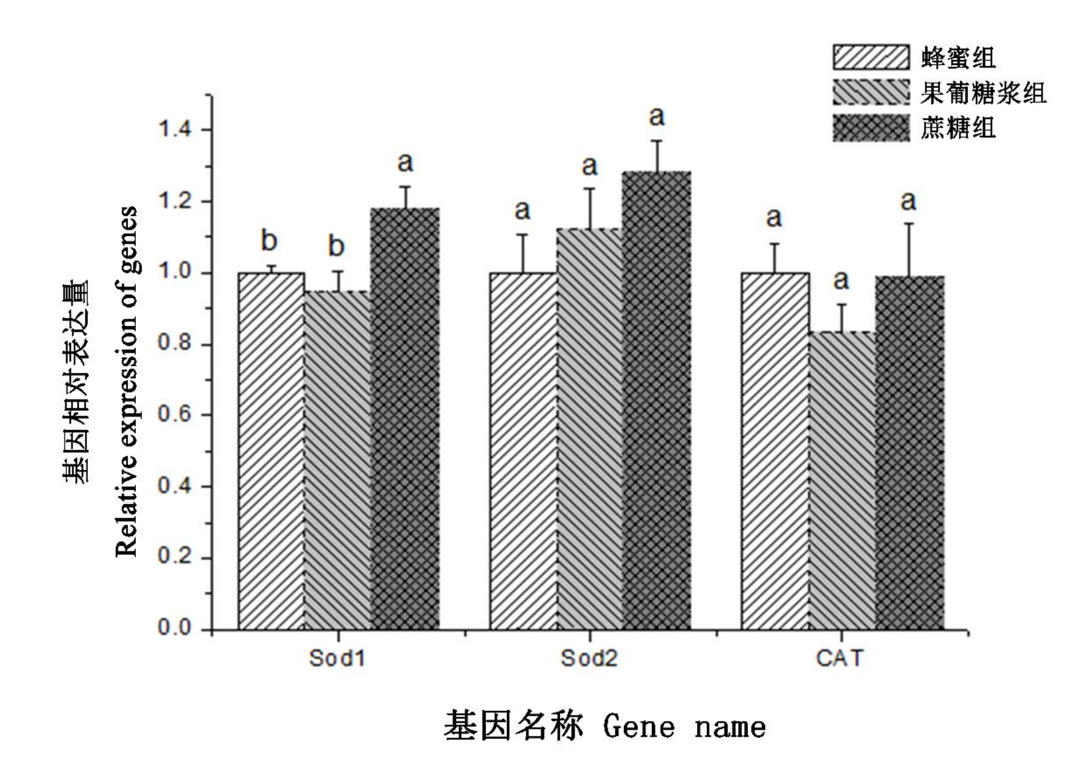
A: midgut histological picture of sucrose group; B: midgut histological picture of honey group; C: midgut histological picture of fructose corn syrup group. In the figure, the red line indicated the intestinal wall thickness, and the blue line indicated the crypt deepness (HE staining, 10×). Date columns with the same letters mean no significant difference (P＞0.05), while with different letters mean significant difference (P＜0.01).

图 4　中肠组织发育状态

Fig.4　Tissue developmental status of midgut

2.5　不同越冬饲料对蜜蜂中肠抗氧化酶基因表达的影响

由图 5 可知，蔗糖组的蜜蜂中肠 *Sod*1 基因的相对表达量显著高于蜂蜜组和果葡糖浆组（P＜0.05），而饲喂不同越冬饲料对蜜蜂中肠 *Sod*2 和 *CAT* 基因的相对表达量的影响不显著（P＞0.05），但蜂蜜组、果葡糖浆组和蔗糖组的蜜蜂中肠 *Sod*2 基因的相对表达量呈依次上升的趋势，同时蜂蜜组和蔗糖组的蜜蜂中肠 *CAT* 基因的相对表达量高于果葡糖浆组。



数据柱标注相同字母表示差异不显著(P＞0.05)，不同字母表示差异显著(P＜0.05)。

Date columns with the same letters mean no significant difference (P＞0.05), while with different letters mean significant difference (P＜0.05).

图 5　中肠抗氧化酶基因的相对表达量

Fig.5　Relative expression levels of antioxidant enzyme genes from midgut

3　讨　论

3.1　不同越冬饲料对蜜蜂中肠消化酶活性的影响

蜂蜜的主要成分是糖类和水分，另外还含有蛋白质、矿物质、维生素、酶等成分[1]。Popek[7]研究表明，蜂蜜中总糖含量占蜂蜜的 72.88%~84.02%，总糖中果糖和葡萄糖含量在 79%以上，另有 1%~6%的蔗糖。王贻节[8]发现，蜂蜜中的糖类除果糖、葡萄糖和蔗糖外，还含有少量的麦芽糖、曲二糖、异麦芽糖、糊精等糖类。白砂糖属于蔗糖，蔗糖营养成分相对单一，是由果糖和葡萄糖脱水缩合形成的双糖，缺乏蛋白质、维生素等营养成分。目前，在蜂群越冬和春繁阶段白砂糖已成为主要的糖饲料。但随着白砂糖价格不断攀升，不少蜂农选择用廉价的果葡糖浆代替白砂糖作为越冬饲料来饲喂蜂群。果葡糖浆通常是以粮食下脚料为原料，以酶法转化粮食淀粉所得的糖化液经葡萄糖异构酶的异构作用，将其中一部分葡萄糖异构成果

糖而形成的一种混合糖糖浆。但在生产过程，酶解不完全会导致糖浆中不溶性颗粒物含量过高，导致蜜蜂不能正常消化，影响蜜蜂的生长发育[2]。

本研究发现果葡糖浆组的蜜蜂在越冬中期中肠内蛋白酶和淀粉酶活性均比蜂蜜组和蔗糖组高。这与工业果葡糖浆中含有未完全酶解的底物物质（如淀粉）和残留的杂质物质（如不溶性蛋白颗粒）有一定关系，机体需要提高消化道内相应酶的活性来帮助蜂体进行消化。因此，果葡糖浆提高淀粉酶和蛋白酶活性并不能作为果葡糖浆更适合作为蜜蜂越冬饲料的依据，需采用试验级的纯果葡糖浆进行深入研究。蜂蜜中含有少量的花粉，而花粉中含有淀粉等多糖[9]，Lotmar[10]指出蜜蜂能少量利用花粉中的淀粉。本研究发现蜂蜜组的蜜蜂中肠内淀粉酶活性在越冬中期显著高于蔗糖组，这可能与蜂蜜中含有花粉有关，为了消化花粉中的淀粉，蜜蜂必须在一定程度上提高肠道中淀粉酶的活性。

蜜蜂消化道中的酶系统在消化食物、吸收营养和能量转化过程中起着极为重要的作用，其与蜜蜂的生命活动和群体生活息息相关[11]。蜜蜂肠道消化酶活性除了会受到饲料糖源类型的影响外，也会受到越冬时间的影响。研究表明蜜蜂在不同时期对蛋白质的需求有所不同[12-13]，在越冬期内越冬蜂不担任哺育工作，而在越冬结束后，越冬蜂需要担任哺育工作其王浆腺功能恢复，对蛋白质的需求增加，因此在越冬中期蛋白酶活性低于越冬前和越冬前后。蜜蜂调节巢温所需的能量主要依靠碳水化合物的分解[14]，这些碳水化合物包括果糖、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖等[15]。在寒冷的冬季，蜜蜂需要更多的能量来维持巢内温度和自身的基础代谢。在越冬期内蜜蜂主要以碳水化合物为食物，蔗糖酶活性升高有助于蜂体消化摄入体内的碳水化合物，从而为蜜蜂提供所需的能量，以利于蜂群安全度过寒冷的冬季。

3.2　不同越冬饲料对蜜蜂中肠组织发育状态的影响

蜜蜂的消化道分为前肠、中肠和后肠。中肠是蜜蜂进行消化和吸收的主要场所。中肠呈环节状，增加了肠壁内吸收面积和肠壁的伸缩性。中肠肠腔内有多层的围食膜包裹食物，可保护中肠细胞不受食物磨损，又可以让中肠消化酶穿过围食膜对食物进行消化，分解的营养物再由中肠细胞吸收[16]。本试验发现，蔗糖组和蜂蜜组的蜜蜂中肠肠壁厚度极显著大于果葡糖浆组，而且蜂蜜组和蔗糖组的蜜蜂中肠隐窝深度比果葡糖浆组要深。可见，蜂蜜和白砂糖有利于中肠肠道的发育和保护，这为春繁期蜜蜂更好地利用和消化营养物质打下了基础，对蜂群的快速繁衍具有促进作用。

3.3 不同越冬饲料对蜜蜂中肠抗氧化酶基因表达的影响

生物体在代谢过程中会产生大量的过氧化氢、羟自由基和超氧阴离子自由基等活性氧，如果过多的活性氧不能及时被机体清除就会导致一系列的氧化损伤，进而引起机体的衰老和病变[17]。为了避免氧化损伤，生物体在进化的过程中形成了一个由酶促系统和非酶促系统构成的复杂且高度保守的抗氧化系统，来清除机体代谢过程中产生的活性氧[18]。超氧化物歧化酶（SOD）是氧自由基的天然清道夫，生物体内 SOD 活性高低是衰老与死亡的直观指标，CAT 可以催化机体内的 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2，从而保护机体组织免受损伤。Williams 等[19]研究表明，抗氧化能力降低是蜜蜂寿命缩短和行为衰老的主要原因，蜜蜂正常代谢时其体内会产生大量的氧自由基，这些氧自由基随蜜蜂的生长发育在体内不断积累，其肤色逐渐变深，生命力也逐渐下降。Wang 等[20]研究表明，营养对工蜂寿命和相关基因的表达有一定的影响，其中花粉显著影响了 *Sod*1 基因的表达，同时该研究发现，饲喂花粉+王浆的蜜蜂生存状况最好，可见抗氧化酶基因的表达可在一定程度上体现蜜蜂的生存状况、健康程度等。

本试验发现，不同越冬饲料对蜜蜂中肠 *Sod*2 和 *CAT* 基因的相对表达量的影响不显著，但蔗糖组的蜜蜂中肠 *Sod*1 基因的相对表达量显著高于蜂蜜组和果葡糖浆组，这表明白砂糖有助于提高越冬蜂中肠的抗氧化能力，从而有利于蜜蜂安全的渡过越冬期。

4 结 论

蜂蜜能够提高越冬蜂中肠消化酶活性，蜂蜜和白砂糖有利于越冬蜂中肠组织的发育，而且蔗糖能够提高越冬蜂中肠抗氧化基因的表达。因此，蜂蜜和白砂糖比果葡糖浆更适合作为蜜蜂的越冬饲料。

参考文献：

[1] 焦震.矿物质和维生素对意大利蜜蜂越冬性能的影响[D].硕士学位论文.泰安:山东农业大学,2012.

[2] 杨海军.果葡糖浆的特性及应用[J].食品科学,2002,23(2):154–156.

[3] 李中礼.优质果葡糖浆可以喂蜂[J].蜜蜂杂志,2012,32(2):18.

[4] 沈育初.白砂糖的最佳代用品——淀粉糖[J].蜜蜂杂志,2006,26(6):41.

[5] 陈渊.用果葡糖浆作越冬饲料得不偿失[J].蜜蜂杂志,2011,30(2):34.

[6] 李家柱.果葡糖浆不可喂蜂![J].蜜蜂杂志,2011,31(11):17.

[7] POPEK S.A procedure to identify a honey type[J].Food Chemistry,2002,79(3):401–406.

[8] 王贻节.蜜蜂产品学[M].北京:农业出版社,1994.

[9] 赵凤奎,胥保华.蜂花粉的抗氧化作用[J].中国蜂业,2013,64(Suppl.2):38–43.

[10] LOTMAR R.Abbau und verwertung von stärke und dextrin durch die honigbiene[J].Archiv für Bienenkunde,1935,16(6):195–204.

[11] 刘彩珍.中华蜜蜂(*Apis cerana cerana* Fabricius)中肠消化酶活性的探讨[D].硕士学位论文.福州:福建农林大学,2001.

[12] HAYDAK M H.Honey bee nutrition[J].Annual Review of Entomology,1970,15:143–156.

[13] HERB B R,WOLSCHIN F,HANSEN K D,et al.Reversible switching between epigenetic states in honeybee behavioral subcastes[J].Nature Neuroscience,2012,15(10):1371–1373.

[14] BEENAKKERS A M T.Carbohydrate and fat as a fuel for insect flight.A comparative study[J].Journal of Insect Physiology,1969,15(3):353–361.

[15] STANDIFER L N.Honey bee nutrition and supplemental feeding[J].Agriculture Handbook-United States Department of Agriculture,1980(335):39–45.

[16] 曾志将.养蜂学[M].2 版.北京:中国农业出版社,2009:32–33.

[17] JIN L H,BAHN J H,EUM W S,et al.Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells[J].Free Radical Biology and Medicine,2001,31(11):1509–1519.

[18] CORONA M,ROBINSON G E.Genes of the antioxidant system of the honey bee:annotation and phylogeny[J].Insect Molecular Biology,2006,15(5):687–701.

[19] WILLIAMS J B,ROBERTS S P,ELEKONICH M M.Age and natural metabolically-intensive behavior affect oxidative stress and antioxidant mechanisms[J].Experimental Gerontology,2008,43(6):538–549.

[20] WANG H,ZHANG S W,ZENG Z J,et al.Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*)[J].Apidologie,2014,45(5):618–625.

Effects of Different Overwintering Feeds on Midgut Digestive Enzyme Activities, Tissue

Development Status and Antioxidant Enzyme Gene Expression of Honeybees

LIU Chunlei　XU Baohua　LIU Zhenguo　WANG Ying　WANG Hongfang*

(*College of Animal Science and Technology*, *Shangdong Agricultural University*, *Tai'an* 271018, *China*)

Abstract: The experiment was conducted to study the effects of different overwintering feeds on midgut digestive enzyme activities, tissue development status and antioxidant enzyme gene expression of honeybees, in order to provide reference for the beekeepers choose winter feed overwintering feeds. At the end of October 2015, nine overwintering colonies of local Italian honeybees (*Apis mellifera* L.) with equal colony population were randomly divided into 3 experimental groups (3 colonies per group), and were fed honey (honey group), fructose corn syrup (fructose corn syrup group) and white sugar water （white sugar:water=2:1, sucrose group） as overwintering feed from November 2 to late November when bee colonies entered into overwintering period, respectively. The experiment lasted from the end of October 2015 to early March 2016. In order to determine the midgut digestive enzyme activities, midgut samples were collected in early November (before overwintering), early January (the middle period of overwintering) and early March (after overwintering), respectively. And, in early January, midgut samples were collected to determine the midgut tissue development status and the relative expression levels of antioxidant enzyme genes, such as superoxide dismutase 1 (*Sod*1), superoxide dismutase 2 (*Sod*2) and catalase (*CAT*) genes. The results showed as follows: the midgut amylase activity of fructose corn syrup group and honey group was significantly higher than that of sucrose group in early January ($P<0.05$). Different overwintering feeds did not significantly affect the midgut sucrase activity in early January and early March ($P>0.05$). The midgut protease activity of fructose corn syrup group was significantly higher than that of sucrose group and honey group in early January ($P<0.05$). The midgut wall thickness of sucrose group and honey group was significantly higher than that of fructose corn syrup group ($P<0.01$), and the midgut crypt deepness of sucrose group and honey group were also significantly higher than that of fructose

*Corresponding author, lecturer, E-mail: wanghongfang22@163.com　(责任编辑　菅景颖)

corn syrup group (P<0.01). The relative expression level of *Sod*1 gene from midgut of sucrose group was significantly higher than that of fructose corn syrup group and honey group in early January (P<0.05). In conclusion, honey can improve midgut digestive enzyme activities of overwintering honeybees, honey and white sugar are beneficial to the development of midgut tissue of overwintering honeybees, and white sugar can improve the midgut antioxidant gene expression of overwintering honeybee. Therefore, honey and white sugar as the overwintering feed for honeybee are better than fructose corn syrup.

Key words: sugar type; overwintering feed; honeybees; midgut digestive enzymes; midgut tissue; antioxidant enzymes